

**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»**



МЕТОДИКА

**ЭКСПЕРТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ
АКОНИТИНА В ТРУПНОМ МАТЕРИАЛЕ**

(шифр специальности – 27.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика экспертного исследования по определению аконитина в трупном материале
2. Шифр специальности методики	27.1(7)
3. Информация о разработчике методики	Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»
4. Сущность методики	Изолирование токсического вещества из объектов биологического происхождения, очистка вытяжек от примесей, для выделения токсических веществ из предварительно очищенных вытяжек. Обнаружения токсических веществ
4.1. Объекты исследования	Биологические жидкости и ткани, промывные воды, другие жидкости
4.2. Методы исследования	Тонкослойная хроматография
4.3. Краткое поэтапное описание методики	<ol style="list-style-type: none"> 1. Выделение аконитина и его метаболитов (бензоилаконина и аконина) из тканей внутренних органов. 2. Периодическая очистка экстрактов 3. Хроматографическая очистка 4. Предварительное исследование 5. Проведение дополнительных подтверждающих исследований в зависимости от количественного содержания 6. Выделение аконитина и его метаболитов (бензоилаконина и аконина) из крови 7. Выделение аконитина и его метаболитов (бензоилаконина и аконина) из мочи 8. Выделение аконитина и его метаболитов (бензоилаконина и аконина) из настойки
5. Дата одобрения методики Ученым Советом Центра судебной медицины МЮ РК	Протокол № 1 от 07.11.2016г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	5
2. Область применения	5
3. Термины и обозначения	5
4. Основная часть	6
5. Заключение	11
6. Список использованных источников	11

1. Введение.

Аконитин (систематическое наименование **аконитина** - (1 α ,3 α ,6 α ,14 α ,15 α ,16 β)-8-ацетокси-20-этил-3,13,15-тригидрокси-1,6-16-триметокси-4-(метоксиметил)аконитанил-14-бензоат) относится к числу очень ядовитых алкалоидов, содержащихся в некоторых видах аконита (борца). Аконитин в указанных растениях находится в смеси с другими алкалоидами. В зависимости от вида аконитов может меняться качественный и количественный состав алкалоидов в растениях, принадлежащих к этим видам. До настоящего времени изучен алкалоидный состав свыше 25 видов аконита. Почти во всех этих видах содержится смесь аконитина, мезаконитина, гипаконитина и ряда аморфных азотистых оснований. Известны виды аконита, содержащие и другие алкалоиды.

Аконитин экстрагируется органическими растворителями из щелочных водных растворов. Максимальные количества этого алкалоида экстрагируются при pH = 8,0...10,0. Однако в определенной степени аконитин экстрагируется и из кислых растворов при pH = 2 и выше.

Действие на организм. Аконитин и настойка аконитов в некоторых странах применяются в мазях как анальгезирующее средство (при невралгиях тройничного нерва, артритах и т. д.).

Как аконитин, так и части растений, содержащие этот алкалоид, могут быть причиной отравлений. Известны случаи отравлений цветами, семенами, клубнями аконитов. Аконитин возбуждает, а затем парализует окончания чувствительных нервов. Он оказывает рефлекторное влияние на сердце и органы дыхания. Позднее наступает паралич центров головного и спинного мозга. Аконитин является одним из самых сильных и быстро всасывающихся ядов. Он хорошо всасывается через пищевой канал. В зависимости от дозы аконитина смерть может наступить через несколько минут. Аконитин быстро разлагается в организме. Образовавшиеся при этом метаболиты из организма выделяются с мочой.

2. Область применения.

Данные процедуры используются при производстве химико-токсикологических экспертиз (исследований) трупного материала с целью установления наличия аконитина и его метаболитов.

3. Термины и обозначения.

Экстракция – процесс извлечения растворителями соответствующих веществ из различных объектов. Объекты, из которых извлекают соответствующие соединения, могут быть твердыми веществами или жидкостями. Поэтому процессы изолирования подразделяют на экстракцию в системе твердое тело – жидкость (твердожидкостная экстракция) и на экстракцию в системе жидкость – жидкость (жидкостная экстракция).

Экстрагент – органический растворитель, в индивидуальном состоянии или содержащий какие-либо реагенты, извлекающий (экстрагирующий) данное вещество из водной фазы.

Экстракционный реагент – составная часть экстрагента, взаимодействующая с извлекаемым веществом с образованием экстрагирующегося соединения.

Экстракт – отделенная жидкая органическая фаза, содержащая экстрагированное из водной фазы вещество.

Резэкстракция – процесс обратного извлечения вещества из экстракта в водную фазу.

Резэкстракт – отделенная водная фаза, содержащая вещество, извлеченное из экстракта.

РК – равновесное отношение концентрации элемента в одной фазе к его концентрации в другой фазе, например в системе из двух несмешивающихся жидкостей R_c может быть больше или меньше единицы;

hRf – значение R_f умноженное на 100, для того, чтобы не оперировать десятичными значениями. Показатель R_f один из основных показателей в ТСХ – параметр зависит как от свойств разделяемых веществ, состава подвижной фазы и сорбента, так и от физических параметров. Определение значения R_f проводят как отношение расстояния прошедшего веществом к расстоянию, прошедшего фронтом растворителя $R_f = L/L_0$. Значение R_f – величина безразмерная и имеет значение от 0 до 1.

4. Применяемые процедуры.

4.1. Выделение аконитина из тканей внутренних органов.

100 г тщательно измельченного органа (желудок, кишечник, печень, почка) смешивают в стакане ёмкостью 300 мл со 100 мл этанола, смесь подкисляют насыщенным спиртовым раствором щавелевой кислоты до pH 2,0 по УИБ и настаивают, при частом перемешивании, в течение 2 часов. Спиртовое извлечение отделяют центрифугированием при 5000 об/мин. В течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают в фарфоровую чашку, ткань органа смешивают со 100 мл этанола, проверяют реакцию среды (pH 2,0) и вновь настаивают в течение 2 часов. Извлечение аконитина подкисленным этанолом проводят три раза.

Объединённые спиртовые извлечения упаривают на термостатированной водяной бане (в термостате или с помощью вакуум-испарителя) при 65° до получения густого остатка (при наличии жира – до полного испарения спирта).

4.2. Очистка извлечения.

Остаток тщательно обрабатывают горячей (90-95°) водой (25 мл х3), выделившийся осадок отделяют центрифугированием. При наличии жира надосадочную жидкость отфильтровывают под вакуумом. Остаток в центрифужном стакане заливают 50 мл воды, подкисленной щавелевой кислотой до pH 2,0 настаивают, при перемешивании, в течение 15 минут, центрифугируют и надосадочную жидкость присоединяют к ранее полученной. Жидкость насыщают при pH 2,0 безводным натрием сульфатом и через 1 час экстрактивные вещества отделяют центрифугированием. Осадок в центрифужном стакане промывают 25 мл насыщенного раствора натрия сульфата, подкисленного щавелевой кислотой до pH 2,0 и отделяют центрифугированием.

Центрифугат (pH 2,0) извлекают эфиром два раза по 60 мл. Водную фазу подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 8,0 и экстрагируют эфиром

(60x2). Эфирные извлечения из щелочного раствора фильтруют через слой безводного сульфата натрия в делительную воронку (натрия сульфат промывают 10 мл эфира) и экстрагируют 0,1 Н. раствором соляной кислоты (15мл x 2). Резкстракт подщелачивают 25 % раствором аммиака до pH 9,0 и экстрагируют эфиром (15 мл x 2). Эфирные извлечения фильтруют через небольшой слой безводного натрия сульфата, промывают 5 мл эфира. Эфир выпаривают при комнатной температуре досуха.

4.2. Выделение аконитина из крови.

100 мл трупной крови смешивают с 25 г безводного натрия сульфата и при перемешивании добавляют небольшими порциями насыщенный спиртовой раствор щавелевой кислоты до полного свёртывания крови. Затем прибавляют 100 мл этанола, настаивают, при частом перемешивании, в течение 2-х часов и проводят исследование по методике, описанной ранее.

4.3. Выделение аконитина из мочи и промывных вод.

100 мл мочи или промывных вод подкисляют **насыщенным** водным раствором щавелевой кислоты до pH 2,0 и прибавляют безводный натрия сульфат до насыщения. Через один час экстрактивные вещества отделяют центрифугированием, осадок промывают 25 мл насыщенного водного раствора натрия сульфата, подкисленного щавелевой кислотой до pH 2,0, и далее исследуют.

4.3. Выделение аконитина из настойки аконитина.

1,0 – 2,0 г настойки аконита смешивают с 10 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты и полученный раствор экстрагируют 10 мл эфира. При необходимости исследования больших объёмов настойки, её упаривают при 650 – 700 до 1 – 2 мл, обрабатывают 10 мл соляной кислоты, фильтруют и экстрагируют эфиром. Водную фазу подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 9,0 и извлекают хлороформом 2 раза по 10 мл. Хлороформные извлечения фильтруют через небольшой слой безводного натрия сульфата, фильтр промывают 5 мл хлороформа и органический растворитель выпаривают при 400 досуха. Остаток подвергают хроматографическому исследованию.

4.4. Хроматографическая очистка и предварительное обнаружение аконитина.

Остаток растворяют в 3 мл хлороформа и переносят 1,0 и 2,0 мл раствора в две фарфоровые чашечки. После концентрирования растворы количественно наносят на стартовую линию тонкого фиксированного слоя силикагеля КСК, забуферённого 0,1н раствором едкого натра, в виде двух полос 1-1,5 см и 2-3 см, соответствующих 1/3 и 2/3 извлечения, хроматографируют в системе этанол-хлороформ 1:5. Метчики-хлороформные растворы аконитина основания, бензоилаконина и аконина, по 0,02мл которых наносят в одну точку на стартовую линию. Длина пробега фронта растворителя 10 см, продолжительность хроматографирования 46-60 мин. Хроматограмму высушивают на воздухе. Зоны метчика и первой полосы, соответствующей 1/3 исследуемого извлечения, опрыскивают модифицированным реактивом йодида

висмута в йодиде калия. При наличии аконитона наблюдается пятно жёлто-оранжевого цвета с R_f 0,68-0,75, параллельного метчику. Открываемый минимум 0,5 мкг аконитина основания в пятне.

При наличии бензоилаконина и аконина проявляются пятна, имеющие R_f соответственно 0,20-0,25 и 0,05-0,10.

При отсутствии на хроматограмме пятна с R_f 0,68-0,75, параллельного пятну аконитина, дают заключение о не обнаружении аконитина.

Описанной методикой обнаруживаются 50 мкг аконитина/ 100 г органа.

Непроявленный участок силикагеля, параллельный проявленным пятнам аконитина и соответствующий 2/3 извлечения, переносят с помощью электроотсасывателя в хроматографическую колонку (20x0,8 см), снабжённую капиллярной насадкой. Элюируют аконитин 10 мл ацетона со скоростью не более 60 капель в мин.

Если при проявлении аконитина было получено слабоокрашенное пятно, то его обрабатывают несколькими каплями 10% спиртового раствора едкого кали и высушивают на воздухе. Обесцвеченный участок силикагеля переносят в хроматографическую колонку и элюируют ацетоном при тех же условиях. Элюаты объединяют и выпаривают при 40° досуха.

4.5. Количественное определение.

Остаток растворяют в 10 мл ацетатного буфера (pH4,5) порциями по 4, 3, 3 мл. Раствор переносят в делительную воронку, прибавляют 0,5 мл раствора метилового оранжевого, 10 мл хлороформа и энергично встряхивают в течение 2-х мин. После отстаивания хлороформный слой, окрашенный в жёлтый цвет, сливают в калиброванную пробирку, добавляют хлороформ до 10 мл и перемешивают. Оптическую плотность раствора замеряют на спектрофотометре при 420 нм в 1 см кювете или на фотоэлектрокалориметре, используя светофильтр с максимумом светопропускания при 410-430 нм. Раствор сравнения - хлороформ.

Если оптическая плотность анализируемого раствора превышает оптическую плотность стандартного раствора, содержащего 100 мкг аконитина в пробе, исследуемый раствор разбавляют хлороформом в различных соотношениях (до 1:10). Степень разбавления учитывают при расчёте. Концентрацию аконитина определяют по калибровочному графику.

Для построения графика определённые объёмы (от 0,1 до 1,0 мл) стандартного раствора аконитина основания помещают в делительные воронки; объём доводят до 10 мл ацетатным буферным раствором и далее исследуют, как описано выше.

Количественное содержание аконитина рассчитывают по формуле:

$$X = 3 \cdot C \cdot V_2 \cdot 100 / 2 \cdot n \cdot V_1 \cdot 1000, \text{ где}$$

X- количество аконитина в 100 г объекта в мг;

C- количество аконитина в 10 мл колориметрируемого раствора, найденное по калибровочному графику в мг;

V_2 / V_1 - разведение окрашенного раствора;

n- навеска объекта в граммах.

Примечание: Если для анализа было взято извлечение, то коэффициент 3/2 следует опустить.

Граница определения – 50 мкг аконитина в 100 г печени.

4.6. Дополнительные исследования.

После количественного определения окрашенный хлороформный раствор выпаривают в фарфоровой чашечке до 0,5 мл и переносят в хроматографическую колонку, содержащую 0,5 г окиси алюминия II степени активности. После впитывания раствора слоем сорбента через колонку пропускают 5 мл ацетона со скоростью не более 60 капель в минуту. При этом метиловый оранжевый сорбируется на окиси алюминия, а аконитин элюируется ацетоном. Ацетоновый раствор выпаривают при 40°, остаток растворяют в 10 мл 0,1н. раствора соляной кислоты и снимают спектр абсорбции в области 220 - 280нм – максимум поглощения наблюдается при 233 – 234 нм. Раствор сравнения – 0,1н. раствор соляной кислоты. Открываемый минимум – 2 мкг аконитина основания в 1 мл раствора.

Граница обнаружения аконитина спектрофотометрическим методом – 250мкг в 100 г объекта.

Исследуемый солянокислый раствор подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 9,0 и экстрагируют хлороформом (5 мл x 2). Хлороформные извлечения фильтруют через небольшой слой натрия сульфата в фарфоровую чашечку и выпаривают при 40° досуха. Остаток растворяют в 2-3 каплях 0,1 н. раствора соляной кислоты и раствор переносят на два предметных стекла с углублениями. К раствору на одном стекле прибавляют каплю 10% раствора аммония (калия) бихромата в 2н. растворе соляной кислоты. Через 5-15 мин. под микроскопом наблюдаются сростки из призматических кристаллов в виде пучков, веток и отдельные призматические кристаллы. Кристаллы анизотропные, угол погасания прямой, знак удлинения отрицательный. Показатели преломления: $n_d = 1.618$.

$n_p = 1.609$; двупреломление: $n_d - n_p = 0,009$. Открываемый минимум – 0,17 мкг аконитина основания.

Граница обнаружения 100мкг аконитина в 100г печени, при условии деления остатка на две части.

К раствору на втором стекле прибавляют каплю раствора роданидного комплекса никеля. Предметное стекло переносят в чашку Петри, насыщенную парами йода. Через 10-30 минут под микроскопом наблюдают пучки и ветки из призматических кристаллов.

Граница обнаружения – 250 мкг аконитина в 100 г. печени.

Если при количественном определении найдено менее 100 мкг аконитина, то проводят одну реакцию с раствором аммония (калия). Положительный результат данной реакции в сочетании с величиной R_f аконитина на хроматограмме могут служить основанием для заключения об обнаружении аконитина.

При обнаружении на хроматограмме пятна с R_f 0,20, - 0,25 (бензоилаконин) непроявленный участок силикагеля, соответствующий этому пятну, переносят в колонку и бензилаконин элюируют ацетоном также, как

аконитин. После испарения ацетона остаток растворяют в 10 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты и снимают спектр абсорбции в диапазоне 220 – 280 нм (раствор сравнения – 0,1 н. соляная кислота). Обнаружение бензоилаконина по величине R_f на хроматограмме и максимуму абсорбции при 233 – 234 нм может служить дополнительным (наряду с обнаружением аконитина) тестом для доказательства отравлений аконитином.

4.7. Цветовые тесты.

4.7.1. Реакции с реактивами группового осаждения алкалоидов.

Аконитин с реактивами Бушарда, Драгендорфа, Майера, Шейблера, Зонненшейна дает осадки.

4.7.2. Реакция с перманганатом калия. На предметное стекло наносят несколько капель хлороформного раствора исследуемого вещества и выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 1—2 капли 1 %-го раствора серной кислоты, а затем каплю 1 %-го свежеприготовленного раствора перманганата калия. При наличии аконитина через 10—20 мин появляются красно-фиолетовые кристаллы (сростки из призм, сфероиды). Предел обнаружения: 0,02 мг аконитина в пробе.

Эти кристаллы по форме отличаются от кристаллов, которые образуются при взаимодействии перманганата калия с кокаином, скополамином, гидрастином и др.

4.7.3. Реакция с роданидом кобальта. В делительную воронку вносят несколько капель раствора исследуемого вещества, прибавляют 3—5 капель 20 %-го раствора гидроксида натрия и 10 мл хлороформа. Содержимое делительной воронки взбалтывают 10 мин. Затем от водной фазы отделяют хлороформную вытяжку, к которой прибавляют 0,2 г винной кислоты, 1 мл раствора роданида кобальта и взбалтывают. При наличии аконитина хлороформный слой приобретает синюю окраску. Такую же окраску дают кокаин, наркотин, папаверин, бруцин и некоторые третичные амины. Эта реакция может быть использована для обнаружения аконитина в его препаратах и в растительном сырье. Приготовление раствора роданида кобальта. Смешивают 1 г нитрата кобальта (II) и 4 г роданида калия. Смесь этих веществ растворяют в 20 мл воды.

4.7.4. Реакция с резорцином и серной кислотой. 5—10 капель исследуемого раствора вносят в фарфоровую чашку и выпаривают досуха. К остатку прибавляют 4 капли 80 %-го раствора серной кислоты и нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Затем прибавляют несколько кристалликов резорцина и продолжают нагревание. Появление красной окраски (через 3—20 мин) указывает на наличие аконитина в пробе. Предел обнаружения: 0,1—0,5 мг аконитина в пробе. Эта реакция малочувствительная. Она рекомендуется для обнаружения аконитина в растительном материале, настойках и в некоторых других объектах.

4.8. Обнаружение аконитина по УФ- и ИК-спектрам. Раствор аконитина в смеси воды и этилового спирта (1 : 1) имеет максимумы поглощения при 228 и 270 нм. Этот препарат в 0,1 н. растворе серной кислоты имеет максимумы

поглощения при 234 и 275 нм. В ИК-области спектра основание аконитина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1092, 1273 и 1713 см^{-1} .

5. Заключение.

Описанная процедура является сводом методов используемых в химико-токсикологическом исследовании на данную группу веществ и предназначена для идентификации и количественного определения соответствующих веществ в биологических объектах и объектах не биологического происхождения.

6.Список использованных источников.

1. «Методические указания. Об определении аконитина при судебно-химическом исследовании биологического материала» МЗ СССР г. Москва-1976г.
2. Крамаренко В.Ф./ Токсикологическая химия./ Киев, «Выща школа», 1989